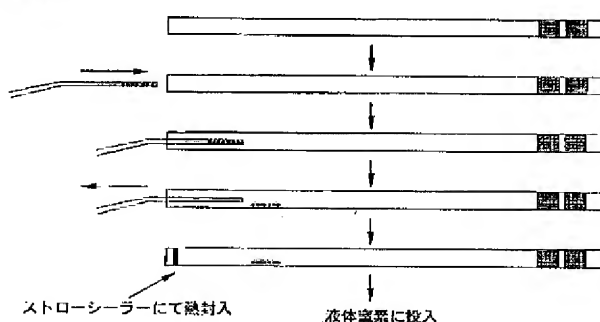


(11)特許出願公開番号  
特開2000-189155  
(P2000-189155A)



【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳動物胚または卵子を滅菌処理した凍結ストロー、凍結バイアルまたは凍結チューブ等の凍結保存用容器の内面に、これらの胚または卵子を包被するに充分な最少量のガラス化液で貼り付け、該凍結保存用容器を密封し、該容器を液体窒素に接触させて急速に冷却してなることを特徴とする哺乳動物胚または卵子の保存方法。

【請求項2】 前記ガラス化液の量が前記胚または卵子1個につき0.5 $\mu$ l以下であることを特徴とする請求項1記載の哺乳動物胚または卵子の保存方法。

【請求項3】 前記凍結保存用容器内に前記胚または卵子を挟んで希釈液層及び希釈液滴を分離収納してなることを特徴とする請求項1または請求項2記載の哺乳動物胚または卵子の保存方法。

【請求項4】 前記胚の前記ガラス化液として約30%エチレングリコールと1Mシュクロースを緩衝液に添加した低毒性のガラス化液を用いることを特徴とする請求項1乃至3の何れか1項に記載の哺乳動物胚または卵子の保存方法。

【請求項5】 前記卵子の前記ガラス化液として約40%エチレングリコールと1Mシュクロースを緩衝液に添加したガラス化液を用いることを特徴とする請求項1乃至3の何れか1項に記載の哺乳動物胚または卵子の保存方法。

【請求項6】 前記胚を前記ガラス化液に暴露する前に、該胚を約15%エチレングリコール溶液または約10%グリセロール溶液に5～10分間平衡処理することを特徴とする請求項4記載の哺乳動物胚または卵子の保存方法。

【請求項7】 前記卵子を前記ガラス化液に暴露する前に、該卵子を約20%エチレングリコール溶液に5～10分間平衡処理してなることを特徴とする請求項5記載の哺乳動物胚または卵子の保存方法。

【請求項8】 請求項1または請求項2の方法で保存した前記凍結保存用容器を前記液体窒素から取出し、該容器の一端部を開口し、該容器内に33℃乃至39℃の希釈液を直接注入し、前記胚または卵子の凍結を融解してなることを特徴とする凍結胚または卵子の融解希釈方法。

【請求項9】 請求項3の方法で保存した前記凍結保存用容器を前記液体窒素から取出し、該容器を33℃乃至39℃の温水中に浸漬して前記胚または卵子の凍結を融解後、軽く振り胚と希釈液を混合してなることを特徴とする凍結胚または卵子の融解希釈方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の利用分野】本発明は哺乳動物卵子及び胚のガラス化保存に関するもので、より具体的には哺乳動物のあらゆる発育段階の卵子及び胚の冷凍保存と融解希釈に利

用することができる方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】哺乳動物胚の凍結保存は、特定の系統や品種の遺伝資源の保存を可能とし、家畜の育種改良、増殖に欠かせない技術であるばかりでなく、絶滅の危機に瀕している動物園動物や野生動物種の維持にも必要とされている。また、ヒトの医療面においても不妊治療プログラムの基幹技術として、その重要性が指摘されている。

【0003】哺乳動物胚の凍結保存の研究は、Smith (1952, 1953)が、精子に対して凍結保護効果があるとされたグリセロール (Polge et al., 1949)を用いてウサギ胚を移植試験のために保存しようとした実験に始まるが、その後20年間、大きな研究の進展は見られなかった。しかし、Whittingham et al. (1972)とWilmut (1972)はそれぞれ独立して、グリセロールと分子構造が類似したジメチルスルフォキシドを凍結保護物質として用いて、緩慢凍結法によって凍結保存したマウス胚が融解後も高い生存性を示すことを報告した。この成功を契機に、哺乳動物胚の凍結保存に関する研究は急速に活発化し、以後、実験小動物の卵子や胚の凍結保存に応用された(ラット: 尾川, 1978; 尾川ら, 1973; 内海と湯原, 1974a, b; Whittingham, 1975; ウサギ: Bank & Maurer, 1974; Whittingham & Adams, 1976; Tsunoda & Sugie, 1977)。

【0004】家畜では、ヒツジ (Willadsen et al., 1974; Schwier et al., 1990)およびヤギ (Bilton & Moor, 1976a)の他、特にウシにおいては、Wilmut & Rowson (1973)による最初の成功例の報告以後、世界的な商業化を背景とした胚移植関連技術開発の進展と共に、優秀な遺伝形質を有するウシ由来の胚の保存や輸送のため、胚の凍結保存技術は胚移植の基幹技術の一つとして研究開発が活発に行われた (Bilton & Moor, 1976b; Willadsen et al., 1976; Leibo & Mazur, 1978; Trounson et al., 1978; Willadsen, 1980; Niemann et al., 1982; Renard et al., 1982; Leibo, 1983, 1984, 1986a, b, 1988; Renard & Heyman, 1983; Chupin et al., 1984; Massip & Van Der Zwalm, 1984; Suzuki et al., 1990; Niemann, 1991)。

【0005】その結果、現在では、胚の凍結保存技術は、研究面のみならず産業面においても広く用いられる重要な技術となった。このため、ウシ胚の凍結保存は実用技術として、さらに、高くかつ安定した凍結保存後の胚生存性が要求されるばかりでなく、処理コストあるいは利便性 (処理の時間や簡易さ) についても改良が求められるようになった。しかし、緩慢凍結には高価な冷却装置が必要であること、処理に長時間を要すること、氷点以上の低温域に一定時間胚を曝すので低温感受性の高い胚や未成熟あるいは成熟卵子では利用できないこと、手法の改善には最適脱水条件の設定などに膨大な数の試

行錯誤を繰り返す必要があり、多大な労力を要することなどの短所が問題となっている。

【0006】これに対し、Luyet (1937)により提唱されたガラス化保存法は、細胞内外の溶液を急速な冷却によりガラス化させて液体窒素温度で保存する方法で、高価な冷却装置を用いず、急速に胚を冷却するため、理想的な実用技術になると考えられたが、その成功例は長く得られなかった(Luyet, 1966; Rapatz et al., 1966; Fahy et al., 1984; Fahy, 1988)。しかし、高濃度の凍結保護物質を用いることにより、植物細胞 (Grout & Henshaw, 1978)や昆虫細胞 (James, 1980)においてのガラス化保存の成功に続き、Rall & Fahy (1985)はマウス8細胞期胚のガラス化保存に成功し、哺乳動物胚のガラス化保存の可能性を示した。この成功を機に、様々な動物の胚においてガラス化保存のアプローチが急速に活発化した。より単純な組成のガラス化液を用いてのマウス胚のガラス化保存の成功例がSheffen et al. (1986)によって報告されたのをはじめとして、実験小動物ではマウス (許ら, 1986; 河野と角田, 1987; 松本ら, 1987; Kasai et al., 1990)、ラット (Kono et al., 1988; Ischenko et al., 1992; Nakamichi et al., 1993)、ウサギ (Kobayashi et al., 1990; Smorag et al., 1989, Smorag & Gadja, 1991; Kasai et al., 1992; Papis et al., 1993)、また、家畜ではヒツジ (Schwier et al., 1990)、ブタ (Yoshino et al., 1993; Kobayashi et al., 1994; Dobrinsky & Johnson, 1994)において、ガラス化保存の成功例が報告された。

【0007】ウシにおいてはMassip et al. (1986) が、Sheffen et al. (1986) のマウスでの方法を応用して、生体から回収した後期桑実胚においてガラス化保存後の生存例を得た。しかし、一般に胚移植に用いられる胚盤胞では生存例は得られず、胚盤胞のガラス化保存の困難さが指摘された (Massip et al., 1986; 堂地ら, 1990; Van Der Zwalm et al., 1989)。また近年、体外受精技術の開発にともなって、その利用価値が実験上のみならず産業面においても急増してきた体外受精由来胚においては、Kuwayama et al. (1992) が胚盤胞において初めての成功例の報告後、同様に高いガラス化保存の成功例が報告されている (Tachikawa et al., 1994)。

【0008】ウシの体外受精胚の野外での本技術の実用化のためには、移植現場で凍結保存胚の融解、希釈が可能な方法の開発が必要である。緩慢凍結法ではすでに、凍結胚を融解後、無希釈で、あるいはストロー内で希釈後、受胎ウシに移植する直接移植法あるいは直接希釈法が用いられている (Leibo 1983; Renard & Heymann, 1983; Massip & Van Der Zwalm 1984; Voelkel & Hu, 1992a, b) が、ガラス化保存した胚においても直接移植を可能とする簡易で実用的な手法の確立が必要である。

【0009】Kuwayama et al. (1994) はストロー内で、ガラス化液に重層した希釈液により、融解後、胚か

ら凍結保護物質を希釈除去してレシピエントへの直接移植を可能とするストロー内希釈法を報告した。同法を用いて実験コンディションで高い受胎率及び正常な産子も得られ、他の研究者による追試でその有効性が示されているが、一般移植技術者レベルでは、同手法で保存した胚の融解、希釈および移植時の取り扱いが困難であり、さらに簡易な手法に改善する必要がある。また、品質が劣る胚盤胞や、体内受精胚では胚移植にも用いられている桑実期胚のガラス化保存後の生存性は十分でなく、これらの胚に適した有効なガラス化保存法の開発が必要である。また、特に受精前の卵子については、動物における体外受精系の普及やヒトの不妊治療手法の劇的な発展に伴い、その必要性が非常に高まっているにも関わらず、卵子細胞の大きさ及び低温感受性の高さから、緩慢凍結保存後の生存はほとんど得られておらず、またガラス化保存を用いても十分な成果は得られていない (Haman et al. 1992, Kuchenmeister & Kuwayama, 1996)。

【0010】Martino (1996) は電子顕微鏡用グリッドを用い、最少化したガラス化液とともに卵子を直接液体窒素に浸漬することにより従来より高いガラス化保存後の生存率を得た。また、Vajta et al. は先端を熱熔解して引き、細長く伸ばした0.25mlプラスチックストロー (Open Pulled Straw: OPS) を用いて、胚を含んだ少量のガラス化液を直接液体窒素に触れさせて冷却することによりガラス化保存後の生存を得た。しかしながら、両方ともに冷却時液体窒素に直接卵子に触れさせるため、ウィルス感染の危険性があり実用化には適さない。さらにグリッド上でガラス化されたサンプルの形状は保存がむずかしく、これはOPS法でも同様、現在既に世界中で0.25mlストロー用に規格、統一されたウシ凍結胚の保存、流通システムを利用するのは困難であり、これらの手法では凍結に用いた容器をそのまま移植に用いる直接移植は不可能である。また現在、家畜の体外受精系では胚生産の効率化、低コスト化の為、多数の同一ドナーあるいは同一種の卵子を一度に多数凍結保存する必要があるが、その手法もいまだ開発されていない。

#### 【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記のような問題点に鑑みてなされたもので、その目的は、哺乳動物胚または卵子を直接液体窒素に接触させることなく、最少量のガラス化液で凍結保存することによって、ウィルスや細菌による感染のおそれ無く高い生存率を得ることのできる保存方法を提供することにある。

【0012】また、本発明の他の目的は、最少量のガラス化液で凍結保存した胚または卵子を迅速にかつ高い生存率を維持しながら融解希釈する方法を提供することにある。

【0013】また、本発明の他の目的は最少量のガラス化液で凍結保存した胚または卵子を直接移植可能に迅速にかつ高い生存率を維持しながら融解希釈する方法を提

供するにある。

#### 【0014】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するため、本発明に係る哺乳動物胚または卵子の保存方法では、哺乳動物胚または卵子を滅菌処理した凍結ストロー、凍結バイアルまたは凍結チューブ等の凍結保存用容器の内面に、これらの胚または卵子を包被するに十分な最少量のガラス化液で貼り付け、この凍結保存用容器を密封し、そしてこの容器を液体窒素に接触させて急速に冷却してなるのである。

【0015】これにより、胚または卵子は密封された凍結保存用容器内にあって、その外部の液体窒素と直接接触することなく凍結されるので、胚または卵子がウイルスや細菌に感染されるおそれが無い。また、最少量のガラス化液を用いているためガラス化液の凍結が迅速で胚または卵子の生存率を高く維持することができる。

【0016】好ましくは、前記方法において、ガラス化液の量を前記胚または卵子1個につき0.5 $\mu$ l以下とすることである。このガラス化液の量は胚または卵子を包被するのに充分であると共に極少量であるから、ガラス化液の凍結が迅速で胚または卵子の生存率を高く維持することができる。

【0017】また、好ましくは、前記方法において、凍結保存用容器内に前記胚または卵子を挟んで希釈液層及び希釈液滴を分離収納することである。これにより、凍結した胚または卵子を融解希釈後に、これらをレシピエントに直接移植することができる。

【0018】また、好ましくは、前記方法において、前記胚のガラス化液として約30%エチレングリコールと1Mシュクロースを緩衝液に添加した低毒性のガラス化液を用いることである。これにより、胚の生存率を更に高めることができる。

【0019】また、好ましくは、前記方法において、前記卵子のガラス化液として約40%エチレングリコールと1Mシュクロースを緩衝液に添加したガラス化液を用いることである。これにより、卵子の生存率を更に高めることができる。

【0020】また、好ましくは、前記胚の保存方法において、胚を前記ガラス化液に暴露する前に、該胚を約15%エチレングリコール溶液または約10%グリセロール溶液に5～10分間平衡処理することである。これにより、胚を直接ガラス化液に暴露する場合に較べて胚の生存率を高めることができる。

【0021】また、好ましくは、前記卵子の保存方法において、卵子を前記ガラス化液に暴露する前に、該卵子を約20%エチレングリコール溶液に5～10分間平衡処理することである。これにより、卵子を直接ガラス化液に暴露する場合に較べて卵子の生存率を高めることができる。

【0022】また、本発明に係る凍結胚または卵子の融

解希釈方法では、前記の方法で保存した凍結保存用容器を前記液体窒素から取出し、該容器の一端部を開口し、該容器内に33℃乃至39℃の希釈液を直接注入し、前記胚または卵子の凍結を融解希釈することである。これにより、凍結した胚または卵子の融解希釈を迅速に行うことができ、胚または卵子の生存率を高めることができる。

【0023】また、好ましくは、直接移植用に前記の方法で保存した凍結保存用容器を前記液体窒素から取出し、33℃乃至39℃の温水中に浸漬して前記胚または卵子の凍結を融解後、軽く振り胚と希釈液を混合してなることである。これにより、胚または卵子の直接移植が可能となる。

#### 【0024】

【発明の実施の形態】以下に本発明の方法について詳述する。本発明で凍結保存に用いられる卵子及び胚の動物種を特定しない。即ち、本発明は、ウシ、ブタ、ヒツジ等に代表される家畜や実験動物、さらにはヒトを含めたあらゆる哺乳動物に適用が可能である。

【0025】凍結保存に用いる凍結容器は受精卵移植用ストロー、精液凍結用ストローあるいは各種凍結保存用チューブやバイアルなど、液体窒素中の保存に耐え、内部を密閉できる容器であればいかなるものでも利用が可能である。

【0026】ガラス化液はこれまでに報告されているあらゆる組成のガラス化液、すなわち、細胞膜透過性凍結保護物質としてグリセロール、プロピレングリコール、ジメチルスルホไซด์ (DMSO)、エチレングリコール、ブタンジオール、及び細胞膜非透過性凍結保護物質としてシュクロース、トレハロース、パーコール、ポリエチレングリコール、ポリヴィニルピロリドン、ウシ血清アルブミン、フィコールなどを添加したガラス化液が利用可能であるが、本発明の方法においては胚については30%エチレングリコールと1Mシュクロースを緩衝液に添加した低毒性のガラス化液、卵子では40%のエチレングリコールと1Mシュクロースを緩衝液に添加したガラス化液において最も高い生存性が得られる。

【0027】卵子および胚をガラス化液に暴露する前、あらかじめ細胞内に低濃度の細胞膜透過性凍結保護物質を浸透させる平衡処理を行うことにより、ガラス化液へ投入時の胚の浸透圧差による物理的損傷を軽減し、さらに冷却・加温時の細胞内氷晶形成を防止することにより、保存後のより高い生存性を得ることが可能である。本発明においては、好ましくは、卵子を20%エチレングリコール溶液に、胚を15%エチレングリコールあるいは10%グリセロール溶液に5ないし10分間平衡して用いる。なお、その作業は胚盤胞では室温下、それ以前の発育段階の胚あるいは卵子では30ないし33℃の温度下で行う。平衡を完了した卵子及び胚は、先端を熱溶解により、細くかつ長く加工したパストゥールピペットによりガ

ラス化液中へ導入される。ここでの主目的は細胞外液の置換であるので、ガラス化液内で試料を移動させ十分に洗浄する。なお、この際、平衡液とガラス化液の極端な浸透圧差により強度の細胞収縮が発生するが、90秒以内のガラス化液暴露においては生存性に影響を及ぼさない。卵子及び胚をガラス化液で洗浄後、同様のパストールピペットにより最少量のガラス化液とともに取りだし、ストロー内へピペット先端を差し込んで、内壁に卵子及び胚を貼り付ける（付着させる）。

【0028】ここで、最少量のガラス化液とは卵子または胚を確実に安全に包被することができる最少量のガラス化液を意味している。即ち、胚または卵子はそれぞれ大きさが異なるが、本発明ではこれらをできるだけ少ない量のガラス化液で確実に安全に包被することで、このガラス化液は多くても0.5 $\mu$ l（マイクロリットル）を越えることがないようにすることである。この量を超えると、ガラス化液の凍結速度が低下して、胚または卵子の生存率が低下する可能性がある。

【0029】本発明において直接移植用に卵子または胚を冷凍保存する場合には、融解時にストロー内希釈を行うことが好ましく、この場合には、あらかじめストロー内に6ないし7cm（0.25mlストローの場合、150～175 $\mu$ l程度）の希釈液（10%鶏卵黄、0.5Mシュウクロースを添加した緩衝液）カラムを吸引により作成しておき、その手前（先端側）に卵子及び胚を含んだガラス化液を貼り付ける。さらにその手前に希釈液の微小滴を作成してからストロー先端を熱あるいは超音波により封入し、ただちに液体窒素に投入して急速冷却し、保存する。凍結バイアル、凍結チューブなど、ストロー以外の容量の大きな凍結容器を用いる場合は、あらかじめ容器を液体窒素中で超低温に冷却しておき、その内壁に胚及び卵子を含んだ最少量のガラス化液を吹きつけるように排出して内壁に固定、冷却する。

【0030】直接移植法用ストローを用いないガラス化液保存の融解については、凍結容器を液体窒素から取りだし、容器の一端部を開口し、ただちに37あるいは38℃の希釈液を凍結容器内に注入、あるいはストローの場合は吸入して融解することにより、高い加温速度が得られ

る。この方法では、融解と希釈が同時に行われるため、1分間の放置後、洗浄し、ただちに融解卵子あるいは胚として実験等に用いることが可能である。

【0031】直接移植法用ストローを用いたガラス化液保存の場合の融解は、33℃～39℃、好ましくは37あるいは38℃の温水にストローを浸漬して胚または卵子の凍結を融解し、さらに融解速度を高めるため、ストローの振とうを行って希釈液の混合を促進する。次いでストロー先端をカットし、移植器にセットしてレシピエントに移植を行う。

【0032】＜発明の実験例＞

実験1 最小容積法による牛胚盤胞のガラス化保存：

＜材料と方法＞実験には常法に従って作出したDay7（媒精日＝Day0）の拡張中胚盤胞を用いた。胚は平衡液（25%エチレングリコール、3mg/mlポリヴィニルピロリドン；PVP M.W.40000、添加PBS）に10分間浸漬後、ガラス化液（25%エチレングリコール、20%シュウクロース、20%PVP 添加PBS）に投入した。ガラス化液投入後、実験区1：胚を従来と同様にストロー内の25 $\mu$ lのガラス化液カラムに導入した（図1参照）、実験区2：胚をストロー内面に最小容量（0.1 $\mu$ l）のガラス化液と共に貼り付けた（図2参照）。実験区1と2はストロー先端を熱封入後、液体窒素に投入して胚を冷却し保存した。実験区1で凍結した胚は、ストローを液体窒素から取り出してから室温下の空気中で10秒間保持後、37℃の温水中で10秒間振とうして融解し、希釈液（10%鶏卵黄、0.5Mシュウクロース、20%子牛血清添加PBS）で凍結保護物質の希釈除去を行った。実験区2では、ストロー内に加温した希釈液を注入することにより胚を希釈液に直接浸漬して1段階で急速に融解した（図3参照）。また実験区3では、実験区2と同じ方法で凍結した胚を実験区1の方法で融解した。

【0033】凍結保護物質の希釈除去後の胚は洗浄培地（10%子牛血清添加TCM 199）で2回洗浄し、同培地で卵丘細胞単層との共培養を38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の条件下で24時間行い、生存性の判定を行った。

【0034】＜結果と考察＞

【表1】

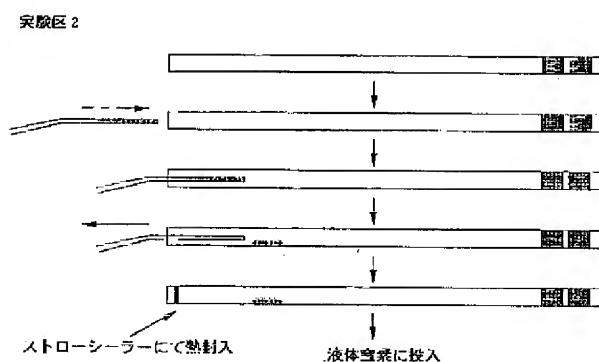
異なる冷却方法がガラス化保存後の牛胚の生存性におよぼす影響

実験区	胚の保持方法	融解方法	供試胚数	生存胚数（%）
1	25 $\mu$ lカラム	2段階	30	17（56.7）
2	最小容量（0.1 $\mu$ l）	1段階	33	25（75.8）
3	最小容量（0.1 $\mu$ l）	2段階	38	11（28.9）

上記実験の結果から明らかなように、実験区2に係る本発明の方法では従来の方法の実験区1の生存率（56.7%）に較べて、顕著に生存率が向上している。

【0035】以上の結果から、最小容積法によりガラス

化保存され、急速に加温した胚の生存率は従来法に比べて有意に高く、同法によりガラス化保存後の胚の生存性が改善されることが明らかとなった。また、最小容積法により凍結した胚は加温を一段階で急速に行うことが好



【図3】

融解 (加温)

